

Evaluation of Beclin 1 and Atg10 gene expression of the autophagy pathway in acute lymphoblastic leukemia patients

Seyede Zahra Hasanpour¹, Mehdi Allah bakhshian farsani², Abbas Hajifathali³, Mohammad hossein Mohammadi²

1.Masters student, Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2.Assistant Professor, Department of Hematology, Faculty of Paramedicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Tel:021-22717504, mohamad.mohamadi2@gmail.com

3.Professor, Bone Marrow Transplantation Center, Taleghani Hospital, Tehran, Iran.

ABSTRACT

Background and Aim: Acute lymphoblastic leukemia is the most common cancer in children and juveniles and is also seen in adults with lower frequency. Autophagy is a programmed catabolic process of the cell for destruction of damaged organs and proteins which is carried out by lysozymes. Disruption of autophagy leads to abnormalities in cellular processes associated with cancer.

Materials and Methods: In this study, we compared the expression of Beclin 1 and Atg 10 genes between 50 patients with B-ALL and 18 healthy subjects as our control group, by using RNA extraction and cDNA synthesis, and RT-PCR method. Data were analyzed by statistical tests.

Results: The majority of B-ALL patients showed a significant reduction in the Beclin1 and Atg 10 genes compared to control group ($P < 0.05$) and the mean expression of the genes ($2^{-\Delta Ct} \pm SD$) were 0.10 ± 0.49 and 1.01 ± 0.27 for ALL patients and control group and 0.15 ± 0.44 and 1.07 ± 0.85 for Atg10 and Beclin1 respectively. There was no significant correlation between expression levels of Beclin1 and Atg10 in these patients ($r = -0.013$, $P = 0.926$).

Conclusion: Considering the reduced expression levels in the essential genes of autophagy in ALL patients in our study and also other studies in this field, disruption of autophagy may be involved in leukomogenesis.

Keyword: Acute lymphoblastic leukemia, Autophagy, Gene expression, Beclin1, Atg 10, RT-PCR

Received: Dec 16, 2018

Accepted: Jan 08, 2018

How to cite the article:

Hasanpour SZ, Allah Bakhshian Farsani M, Hajifathali A, Mohammadi MH. **Evaluation of Beclin 1 and Atg10 gene expression of the autophagy pathway in acute lymphoblastic leukemia patients.** SJKU 2018; 23 (6): 142-151.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

بررسی بیان ژن های ۱ Beclin و ۱۰ Atg مسیر اتوفاژی در مبتلایان با لوسمی لنفوبلاستی

حاد

سیده زهرا حسن پور^۱، مهدی اله بخشیان فارسانی^۲، عباس حاجی فتحعلی^۳، محمد حسین محمدی^۲

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

۲. استادیار، گروه خون شناسی و بانک خون، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، تلفن ثابت: ۲۲۷۱۷۵۰۴

۰۲۱ mohamad.mohamadi2@gmail.com

۳. استاد، مرکز پیوند مغز استخوان، بیمارستان آیت الله طالقانی، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) سرطانی است که اغلب، کودکان و نوجوانان را در معرض خطر قرار می دهد و با نسبت کمتر در بزرگسالان نیز دیده می شود. اتوفاژی فرایند کاتابولیک برنامه ریزی شده سلول برای تخریب اندامها و پروتئین های آسیب دیده است و این عمل را توسط لیزوزم ها به انجام می رساند. اختلال در اتوفاژی منجر به ناهنجاری هایی در فرآیندهای سلولی می شود.

روش بررسی: در این مطالعه، بیان ژن های ۱ Beclin و ۱۰ Atg در ۵۰ بیمار مبتلا به B-ALL در مقایسه با ۱۸ فرد سالم به عنوان شاهد با استفاده از استخراج RNA و سنتز cDNA و در آخر روش RT-PCR و به کارگیری آزمون های آماری ارزیابی شد.

یافته ها: اکثر بیماران B-ALL کاهش معنی داری در ژن های ۱ Beclin و ۱۰ Atg را نسبت به گروه شاهد نشان دادند ($P < 0/05$) و میانگین سطح بیان ($2^{-\Delta Ct} \pm SD$) برای بیماران ALL و افراد کنترل به ترتیب $0/49 \pm 0/10$ و $0/27 \pm 0/01$ برای ۱۰ Atg و $0/44 \pm 0/15$ و $0/85 \pm 0/07$ برای ۱ Beclin بود. همبستگی معنادار بین بیان ژن های ۱ Beclin و ۱۰ Atg در این بیماران مشاهده نشد ($P = 0/926$) و ($r = -0/013$).

نتیجه گیری: با توجه به کاهش سطوح بیان شده در ژن های ضروری اتوفاژی در بیماران B-ALL تحت مطالعه ی ما، تصور بر این است که اختلال در اتوفاژی می تواند در لکوموئوز دخیل باشد و به عنوان عاملی مؤثر در پیشبرد سرطان در نظر گرفته شود.

کلیدواژه: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، اتوفاژی، بیان ژن، ۱ Beclin، ۱۰ Atg، RT-PCR

وصول مقاله: ۹۶/۹/۲۵ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۰/۱۷ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۴

مقدمه

سرطان خون با تکثیر افسار گسیخته‌ی سلول بدخیم در مغز استخوان و خون محیطی بروز می‌کند. در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) اختلال در لنفوبلاست های تمایز نیافته باعث می‌شود این سلول‌ها در مغز استخوان و سیستم لنفاوی به تعداد زیاد تولید و در ادامه وارد جریان خون شوند. در حالی که در افراد سالم این سلول‌ها محدود به مغز استخوان اند (۱). ALL هم در کودکان و هم در افراد بالغ امکان وقوع دارد و نقطه‌ی اوج آن بین سنین ۲ تا ۵ سال است (۲). میزان بقا در لوسمی لنفوبلاستی حاد در دوران کودکی نزدیک ۹۰٪ است، ولی درمان در نوزادان و افراد میان‌سال نیاز به پیشرفت دارد (۳). علت اصلی ALL دقیقه مشخص نیست اما وجود برخی از اختلالات کروموزومی و ژنتیکی در سلول بلاست، فاکتورهای رونویسی کلیدی و مسیرهای سیگنالینگ سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱). با توجه به اینکه ALL رایج‌ترین سرطان در کودکان و نوجوانان است، در بزرگ‌سالان نیز با نسبت کمتری دیده می‌شود. تاکنون پیشرفت های چشمگیری در زمینه‌ی درمان این بیماری انجام گرفته است به طوری که میزان بقای طولانی مدت در کودکان به بیش از ۸۵٪ و در بزرگ‌سالان به حدود ۴۵٪ رسیده است (۳ و ۴) ولی با این وجود هنوز چالش‌هایی در درمان ALL مطرح است که نیازمند بررسی‌های بیشتر در این زمینه است. نظر به اینکه ممکن است در سلول‌های سرطانی مراحل تکثیر، متابولیسم، بقا و در نهایت مرگ سلول دچار اختلال می‌شود، اتوفازی به‌عنوان مکانیسمی حیاتی در سلول که به نوعی در کنترل تکثیر و متابولیسم و همچنین کنترل بقا و مرگ سلولی دخیل است، در بیماران ALL مطرح شده است (۵)؛ بنابراین ممکن است تحقیق روی مکانیسم های کمتر شناخته شده در سلول زمینه را برای شناخت عوامل ایجاد کننده‌ی سرطان فراهم کند و در درمان آن نیز کمک‌کننده باشد. اتوفازی در طی شرایط نامطلوب در سلول، مثل گرسنگی و فقر غذایی در

سلول، هایپوکسی، آسیب به DNA، عفونت با میکرو ارگانیسم‌ها و پاتوژن‌ها و استرس اکسیداتیو در سلول فعال‌تر می‌شود و بقای سلول را حفظ می‌کند (۶). از تنظیم خارج شدن اتوفازی باعث استعداد ابتلا به اختلالات مختلف از جمله سرطان می‌شود. در لوسمی‌ها نیز بسته به زمینه‌ی سلول و فاکتورهای تنظیمی و مسیرهای سیگنالینگ درگیر در سلول، مکانیسم عمل اتوفازی متفاوت است (۷). در طی چند سال اخیر مقالات متعددی نقش اتوفازی را در سلول‌های لوسمیک حاد بررسی کرده اند که نشانگر این است که اتوفازی در لوسمی حاد مانند یک شمشیر دو لبه عمل می‌کند. در برخی از مطالعات گفته شده که اتوفازی مکانیسمی سرکوب‌کننده در برابر تومورزایی و رشد تومور است. این نقش اتوفازی ممکن است به دلیل افزایش تخریب پروتئین‌هایی باشد که منجر به تحریک رشد سلولی می‌شوند و در صورتی که تعداد این پروتئین‌ها در سیتوزول کاهش نیابد ممکن است به تکثیر افسار گسیخته سلول منجر شود (۸). همچنین اتوفازی با حذف ارگان‌های آسیب دیده مثل میتوکندری و پراکسی زوم که حاوی گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS) هستند، از آسیب به DNA ی سلول جلوگیری می‌کند و باعث کاهش ریسک جهش و کاهش ناپایداری در ژنوم می‌شود؛ بنابراین از ایجاد تومور و رشد آن جلوگیری می‌کند (۹). برخلاف نقش تومورسپرسوری، اتوفازی ممکن است با مقاومت در برابر داروهای شیمی‌درمانی و مکانیسم‌های مختلف به بقای سلول سرطانی نیز کمک کند و یک الفاکنده تومور به حساب بیاید، به‌خصوص در سرطان‌های توپر به دلیل آنژیوژنز و عدم وجود مواد مغذی کافی برای سلول و یا در سلول‌های متاستازی که به علت جدایی از ماتریکس خارج سلولی و مهاجرت، سلول‌های سرطانی با کمبود انرژی مواجه می‌شوند، اتوفازی به عنوان مکانیسمی محافظتی زمینه و انرژی مورد نیاز برای رشد سلول سرطانی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، اتوفازی ممکن است با تخریب میتوکندری

اساس در این پژوهش، تلاش بر آن بوده است که با در نظر داشتن طبقه‌بندی بیماران مبتلایان به ALL به ۴ زیرگروه pro B-ALL، early pre B-ALL، pre B-ALL و mature ALL، سطح بیان ژن‌های مرتبط با مسیر اتوفازای شامل *Beclin 1* و *Atg 10* در این بیماران نسبت به افراد سالم بررسی شود.

روش بررسی

جمعیت مورد مطالعه: این پژوهش از نوع مورد-شاهد است. در این پژوهش، ۵۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد از نوع B-ALL (پس از اخذ رضایت کامل از تمامی آن‌ها) و همچنین ۱۸ فرد به ظاهر سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. انتخاب بیماران بر حسب ترتیب مراجعه‌ی آن‌ها به مراکز درمانی تحت مطالعه در سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶، در دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است و برای انتخاب گروه کنترل نیز همسان‌سازی مطرح نبوده است. تشخیص با توجه به مشاهده‌ی مورفولوژی سلول‌ها روی لام خون محیطی (PB) یا لام مغز استخوان (BM) و تعیین ایمونوفنوتایپ سلول‌ها با فلوسایتومتری و آزمایش مولکولی انجام گرفت. طبق نظام طبقه‌بندی فرانسوی-آمریکایی-بریتانیایی (FAB)، بیماران به چهار زیرگروه شامل pro B-ALL، early pre B-ALL، pre B-ALL و mature B-ALL تقسیم شدند. برای فلوسایتومتری، از آنتی‌بادی‌های در برابر CD10، CD19، CD20، TDT و CD22 استفاده شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA:

برای تعیین سطح بیان mRNA بلافاصله پس از نمونه‌برداری، سلول‌های تک‌هسته‌ای در نمونه‌ی خون محیطی با استفاده از سانتریفوژ شدن فایکول جدا شدند و دو بار با بافر فسفات (PBS) شسته شدند. استخراج RNA با استفاده از کیت Qiagen (USA) و بر اساس پروتکل انجام شد. سپس کیفیت RNA ی استخراج شده با استفاده

های آسیب‌دیده‌ی حاوی ROS در حفظ سلول سرطانی کمک‌کننده باشد (۸ و ۹). اتوفازای به طور گسترده به فرایندهای کاتابولیک سلولی اشاره می‌کند که در آن مواد سیتوپلاسمی برای تخریب به لیزوزوم‌ها منتقل می‌شوند و اغلب به عنوان سازوکاری برای حفظ بقای سلول هست (۱۰). به عنوان مثال از طریق حذف پروتئین‌هایی که به اشتباه تا خورده و تجمع یافته‌اند و همچنین حذف اندامک‌های آسیب‌دیده در سلول، زمینه را برای هماتوپوئز فراهم می‌کند. مکانیسم مولکولی اتوفازای و پروتئین‌های مرتبط با این مسیر که به آن‌ها پروتئین‌های مرتبط با اتوفازای (*Atg*) می‌گویند. این پروتئین‌ها به صورت سلسله مراتبی برای تنظیم هر مرحله از فرایند اتوفازای به کارگرفته می‌شوند (۱۱). فرآیند اتوفازای به طور کلی از چندین مرحله متوالی تشکیل شده است. این مراحل شامل: (۱) القای مسیرهای منتهی به اتوفازای، (۲) انتخاب ارگان‌ها و پروتئین‌هایی که نیازمند تخریب هستند، (۳) هسته‌گذاری و تشکیل غشا (فاگوفور)، (۴) گسترش و تکامل اتوفازوزوم، (۵) بازسازی اجزای مجدد استفاده شده (۶) ادغام لیزوزوم با غشای اتوفازوزوم و تشکیل فاگولیزوزوم و در نهایت (۷) تجزیه و بازیابی اجزای سلولی، که در این مراحل پروتئین‌هایی از جمله *Atg 10* و *Beclin 1* نقش‌های مهمی را ایفاء می‌کنند (۱۲). پروتئین *Beclin 1* جزئی از کمپلکس فسفاتیدیل اینوزیتول-۳-کیناز کلاس III (PIK3C3) است که نقشی اساسی در هسته‌گذاری و تشکیل اتوفازوزوم بر عهده دارد (۱۳) و همچنین به نظر می‌رسد در تومور زایی، نروژنز و مرگ سلولی نیز دخالت داشته باشد (۱۴). *Atg 10* نیز پروتئینی است که در طی شکل‌گیری غشای اتوفازوزوم نقشی آنزیمی دارد (۱۳). تمرکز مطالعات بیشتر روی نقش اتوفازای در ارتقا و یا سرکوب رشد سلول سرطانی است که ناشی از فعال‌سازی و یا مهار اتوفازای طی لوسمی بوده است و بسته به زمینه‌ی سلول سرطانی، به عنوان ابزاری برای درمان این نوع بدخیمی هماتولوژی مد نظر است (۸). بر همین

رقت‌هایی از cDNA آماده‌شده، تعیین شد. به‌عنوان کالیبراتور، میانگین بیان *Beclin 1* و *Atg 10* در داوطلبان سالم به دست آمد. سپس مقادیر Ct حاصل از *Beclin 1* و *Atg 10* در برابر ژن مرجع داخلی ABL، برای نمونه‌های ALL و افراد نرمال کنترل شد و در ادامه یک مقایسه آماری بین مقادیر نرمال شده از این نمونه‌ها انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری:

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و GraphPad Prism 6 انجام شد. با استفاده از تست Shapiro-Wilk و Kolmogorov-Smirnov، نرمال بودن توزیع برای بیان نسبی *Beclin 1* و *Atg 10* در بیماران ALL و گروه کنترل محاسبه شد. علاوه بر این، از آزمون t برای تعیین اختلاف معنی‌داری بین بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در بیماران ALL و گروه کنترل وجود دارد، استفاده شد و همچنین از آزمون pearson برای بررسی وجود یا عدم وجود همبستگی خطی بین بیان *Beclin 1* و *Atg 10* استفاده شد. برای ارزیابی بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* بین زیرگروه‌های مختلف ALL از نظر FAB، تست One-Way ANOVA مورد استفاده قرار گرفت و نتایج به صورت میانگین \pm خطای استاندارد (mean \pm SD) محاسبه شدند.

نتایج

مشخصات نمونه‌ی بیماران: نمونه‌هایی که در این تحقیق مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند از ۵۰ بیمار مبتلا به ALL که تازه تشخیص داده شده و هنوز تحت درمان قرار نگرفته بودند و از نظر جنس و سن و ویژگی‌های مورفولوژیک متغیر بودند، دریافت گردید (جدول ۱). فراوانی بیماران از نظر زیرگروه‌های ALL و بر اساس دسته‌بندی مورفولوژیک FAB / WHO در این مطالعه به شرح زیر است: ۵ مورد Pro B-ALL، ۱۴ مورد early pre B-ALL، ۲۰ مورد Pre-B-ALL و ۱۱ مورد mature B-ALL

از الکتروفورز آن روی ژل آگارز ۱/۵٪ و مشاهده باندهای 18 s و 28 s که مربوط به RNA ریوزومی اند بررسی شد. غلظت نمونه های RNA با استفاده از سنجش میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ سنجیده شد. سنتز cDNA به وسیله‌ی آنزیم نسخه‌بردار معکوس کاتالیز می‌شود به RNA الگو و پرایمر الیگو dT نیاز دارد. برای سنتز از کیت (fermentase) استفاده شد. نمونه‌های c-DNA ساخته شده تا زمان انجام تست در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و برای تأیید صحت تولید، cDNA سنتز شده توسط پرایمر ژن ABL تکثیر شد و محصول روی ژل آگارز ۱/۵٪ برده شد. به منظور تکثیر هر قطعه ژنی، یک جفت پرایمر اختصاصی برای هر ژن طراحی شد که شامل پرایمر مستقیم و معکوس بود. ژن ABL به عنوان ژن رفرانس و برای نرمالیزه کردن میزان بیان ژن‌های هدف انتخاب گردید.

سنجش کمی بیان ژن‌ها (qRT-PCR):

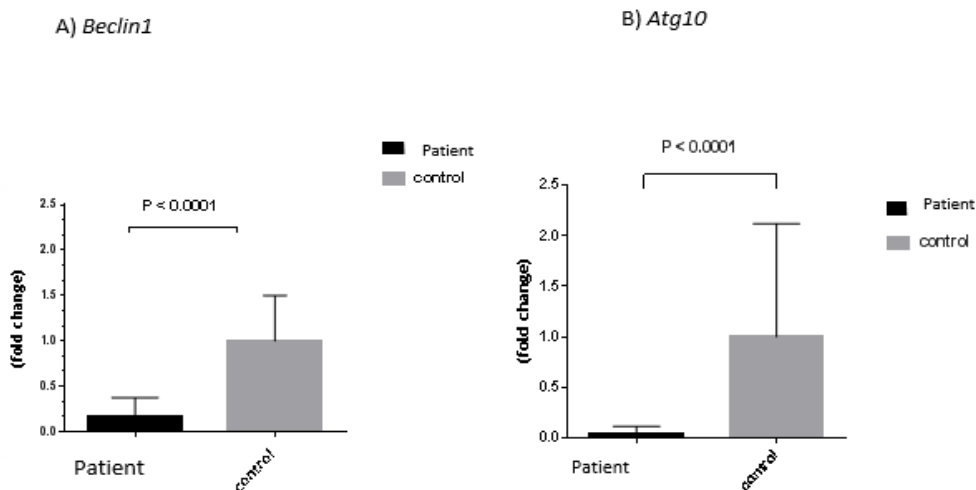
در این تحقیق به منظور تعیین میزان بیان ژن‌ها بعد از مرحله تهیه‌ی معرف‌های لازم برای انجام Real-time PCR، نمونه‌ها به‌صورت دوتایی در دستگاه Rotor-Gene برای انجام تست قرار داده شدند. در ابتدا Ct ژن هدف از Ct رفرنس ژن کم می‌شود و به این ترتیب Δ Ct گروه بیمار و کنترل به دست می‌آید. در مرحله بعد به منظور به دست آوردن میزان بیان نسبی ژن در گروه بیمار نسبت به گروه کنترل، از $2^{-\Delta$ Ct گروه کنترل میانگین گرفته تا یک عدد واحد به دست آید و سپس تک تک $2^{-\Delta$ Ct در گروه بیماران را بر عدد دست آمده در گروه کنترل تقسیم می‌شود و به این ترتیب Fold change میزان بیان نسبی ژن‌ها در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل به دست می‌آید. سطوح بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* با استفاده از real-time PCR در نمونه‌های بیماران و افراد سالم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۵). برای اعتبار سنجی روش آزمایش، کارایی (efficiency) تکثیر ژن‌های مرجع و هدف، با تهیه

جدول (۱): مشخصات دموگرافیک بیماران که بر اساس سن، در صد بلاست، جنس و زیر گروه‌های ALL مشخص شده است.

مشخصات	تعداد بیماران (۵۰)
سن	میانگین: ۲۵/۳۴ محدوده: ۱-۹۰
درصد بلاست	میانگین: ۷۴/۷۱ محدوده: ۲۲-۹۸
جنس	مرد: ۲۹ (%۵۸) زن: ۲۱ (%۴۲)
زیر گروه‌های ALL	pro B-ALL: ۵ (%۱۰) early pre B-ALL: ۱۴ (%۲۸) pre B-ALL: ۲۰ (%۴۰) B mature-ALL: ۱۱ (%۲۲)

اختلاف معنی‌داری بین بیان mRNA ی ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در بیماران و افراد سالم وجود دارد. میانگین سطح بیان ($2^{-\Delta Ct} \pm SD$) برای بیماران ALL و افراد کنترل به ترتیب 0.15 ± 0.10 و 0.27 ± 0.10 برای *Atg 10* و 0.44 ± 0.15 و 0.85 ± 0.07 برای *Beclin 1* بود (شکل ۱).

بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در بیماران ALL و افراد سالم: سطوح بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در نمونه‌های بیماران و افراد سالم مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و با توجه به مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌ها، مشاهده شد که



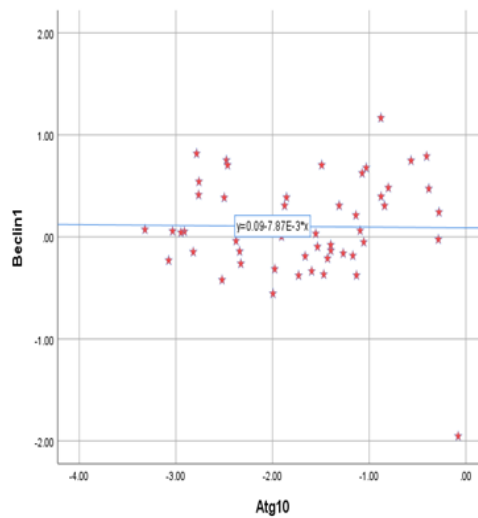
شکل (۱): مقایسه‌ی میانگین بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در دو گروه بیمار و کنترل است. A: نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنادار بین میانگین بیان ژن *Beclin 1* در دو گروه بیمار و کنترل است ($p < 0.001$). B: نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنادار بین میانگین بیان ژن *Atg 10* در دو گروه بیمار و کنترل است ($P < 0.001$).

بحث

بررسی ما نشان می‌دهد که ژن‌های اتوفازی در بیماران ALL با تغییراتی مواجه شده‌اند. در واقع اتوفازی مکانیسمی است که عملکرد آن به هر دو حالت سلامت و بیماری مرتبط است. در حالت طبیعی، به سازگاری سلول در شرایط تحت استرس، همچنین به توسعه و تمایز سلول، ایمنی و طول عمر کمک می‌کند ولی فعالیت بیش از حد و یا کمتر از حالت نرمال اتوفازی می‌تواند در ایجاد برخی از بیماری‌ها از جمله سرطان دخیل باشد. در ارتباط با بدخیمی‌ها، اتوفازی در دو سطح متناقض نسبت به هم مطرح می‌شود که یکی در کمک به توسعه و پیشرفت سرطان و دیگری در سطح درمان سرطان است. نتایج ما در این مطالعه نشان داد که بیان ژن‌های اتوفازی شامل *Beclin 1* و *Atg 10* در بیماران ALL دچار کاهش شده است که برخلاف شرایط فیزیولوژیکی است. با مشخص کردن رنج طبیعی این ژن‌ها در جامعه کنترل نرمال و در نظر گرفتن حد بالایی ۹۵٪ اطمینان در میزان بیان این ژن‌ها در این افراد، مشاهده کردیم که از جامعه ۵۰ نفری از بیماران B-ALL، ۴۸ نفر کاهش میزان بیان *Beclin 1* و همگی بیماران کاهش میزان بیان *Atg 10* را نشان دادند. در همین راستا بررسی‌هایی در سطح کلینیکال و بر روی سل‌لاین‌های تومورهای توپر و سل‌لاین‌های سرطان‌های هماتولوژیک انجام گرفته است که با نتایج ما همسو هستند. این نتایج نشان می‌دهد غیر فعال شدن ژن‌های خاصی از اتوفازی مانند *Beclin 1* منجر به گسترش تومور در موش‌ها می‌شود و بیان ژن *Beclin 1* منجر به مهار تشکیل تومور سینه در مدل‌های موشی می‌شود (۱۶). مطالعاتی نیز نشان داد که ژن *Beclin 1* به صورت یکنواخت در ۵۰٪ موارد سرطان پستان حذف می‌شود (۱۷). در سرطان سرویکس نیز *Beclin 1* نقش مهمی در تنظیم فعالیت قوی ضد تومور دارد و افزایش بیان *Beclin 1* در سلول‌های این سرطان، می‌تواند سیگنال‌های مرگ ناشی از داروهای ضد سرطان را افزایش دهد (۱۸).

بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* در زیرگروه‌های بیماران ALL از نظر ایمونوفنوتایپ: با تفکیک بیماران به ۴ زیرگروه Pro B-ALL، Pre-B-ALL، mature B-ALL و *Beclin 1*، تفاوت معناداری بین $P=0.71$ و $p=0.23$ ، به ترتیب با بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg10*، مشاهده نشد.

همبستگی بین سطوح بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10*: با تجزیه و تحلیل آماری انجام گرفته به منظور تعیین وجود یا عدم وجود همبستگی معنادار بین بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10*، نشان داد که در هر دو گروه بیماران ALL و گروه کنترل نرمال بین بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* همبستگی معناداری مشاهده نشد (شکل ۲).



شکل (۲): نشانگر عدم وجود همبستگی معنادار بین بیان ژن‌های *Beclin 1* و *Atg 10* است. با توجه به سطح معناداری $P=0.926$ و ضریب همبستگی $r = -0.013$ ، ارتباط معناداری بین بیان ژن *Beclin 1* و *Atg 10* وجود ندارد و می‌توان گفت که بیان این دو ژن تحت تأثیر یکدیگر نیستند.

مکانیسم هایی که تلاش می کنند تا بلاست ها را لوکمیک کنند، از یکی از سد هایی که باید عبور کنند و آن را به کنترل خود دریاورند، اتوفاژی است که البته تأیید این فرض نیازمند بررسی های گسترده تری است. شواهد نشان می دهد که بسته به شرایط سلول، مهار و یا سرکوب اتوفاژی به لوکومونزیزیس کمک می کند؛ یعنی همان طوری که سلول لوکمیک فارغ از رده، گروه و زیرگروه باید در سطح بیرونی سلول از سد سیستم ایمنی عبور کند تا بدخیمی منتشر شود، در سطح داخلی نیز باید از سد اتوفاژی عبور کند تا بتواند با موفقیت مسیر لوکومونزیزیس را پیش ببرد. البته همچنان چه برای عبور از سد دفاعی ایمنی راهکارهای متفاوت و در مواقعی متضاد در پیش می گیرد برای عبور و مهار اتوفاژی هم لزوماً از یک مسیر پیش نمی رود. در تأیید این گفته، در بدخیمی های مقاوم مطالعاتی انجام شده که پیشنهاد می کنند، باید ژن های اتوفاژی را غیر فعال کنند تا سلول لوکمیک به سمت مرگ برود که این حالت بیشتر زمانی مورد بحث است که سلول سرطانی در برابر درمان از خود مقاومت نشان می دهد (۲۳). این موضوع می تواند نشان دهنده این حقیقت باشد که هر چند در ابتدا بیان اتوفاژی پایین است اما در بیمارانی که به هر دلیلی مقاومت در برابر درمان نشان می دهند، پروسه لوکومونزیزیس می تواند از مسیر اتوفاژی به عنوان سیستم مقاومتی استفاده کنند و راهکار ارائه شده در این موارد مهار و کاهش بیان ژن های سیستم اتوفاژی است (۲۴).

نتیجه گیری

با توجه به این که کاهش میزان بیان ژن های *Beclin 1* و *Atg10* در بیماران B-ALL با مسیر سیگنال دهی mTOR/ AKT و اختلال در آن همراه است و همچنین بیان این ژن ها برای شکل دهی اتوفاژی در سلول الزامی است از این جهت می توان گفت اکثر بیماران

همچنین در مطالعه ای روی بیماران مبتلابه سرطان معده چندین ژن اتوفاژی بررسی شده و مشاهده شده که کاهش بیان *Beclin 1*، *ULK1* و *Atg10* در ارتباط با متاستاز سرطان است (۱۹)؛ بنابراین با توجه به این شواهد، کاهش بیان *Beclin 1* و *Atg10* در مبتلایان به ALL، در مطالعه ی ما نیز حاکی از اهمیت فقدان این ژن ها در توسعه این بیماری است و اثر ضد لوکومونزیزیس اتوفاژی را نشان می دهد. با کاهشی که در بیان ژن های *Beclin 1* و *Atg10* در بیماران قبل از درمان مشاهده کردیم و نتایجی که بعد از درمان در سایر تومورها و لوکمی ها دیده شده است، می توان گفت که کاهش ژن های اتوفاژی راه را برای پروسه های لوکومونزیزیس هموارتر می کند و این نتیجه برداشت می شود که با افزایش اتوفاژی توسط داروها، می توان در برابر این روند مقاومت نمود. در همین راستا مطالعات نشان داده اند که با اعمال اثر داروهای مرتبط با اتوفاژی روی سل لاین های ALL، از جمله داروی Everolimus روی سل لاین های primary، NALM6، RS4;11، REH، SEM cells (۲۰) و همچنین داروی FTY720 روی سل لاین های primary، LK63، NALM6، REH، ALL1 cells (۲۱)، بیان ژن های اتوفاژی افزایش می یابد که می تواند نشانی از کاهش اتوفاژی در سلول لوکمیک بوده باشد، هر چند که افزایش عملکرد به دنبال تیمار دارویی لزوماً کاهش بیان ژن در بیماری را نشان نمی دهد. از آنجایی که پروسه ی لوکومونزیزیس در کلیه بیماران ALL یکسان نیست و با توجه به اینکه نوع جهش و ایمونوفنوتایپ در زیر گروه های ALL متفاوت است (۲)، با این حال نتایج ما نشان می دهد که بین میانگین بیان ژن های *Beclin 1* و *Atg10* در زیر گروه های B-ALL شامل Pro B-ALL، mature B- و Pre-B-ALL، early pre B-ALL، تفاوت معناداری وجود ندارد و از طرفی در اکثر قریب به اتفاق بیماران تحت مطالعه ی ما، اتوفاژی کاهش پیدا کرده است که می توان این فرض را مطرح کرد که

در به انجام رساندن این پژوهش مساعدت کردند، کمال تشکر و قدردانی را داریم.

مبتلا به B-ALL در این تحقیق، کاهش در بیان ژن های اتوفازی را بروز دادند.

تشکر و قدردانی

از کارکنان مرکز پیوند مغز استخوان بیمارستان طالقانی تهران که در جمع آوری نمونه ها و انجام مراحل آزمایشگاهی همکاری کردند و همچنین تمامی کسانی که

Reference

1. Ekiz HA, Can G, Baran Y. Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;81:275-85.
2. Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2012;30:1663-9.
3. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2013;381:1943-55.
4. Pui C-H, Crist WM. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr* 1994;124:491-503.
5. Yang Y-p, Liang Z-q, Gu Z-l, Qin Z-h. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:1421-34.
6. Ekiz HA, Can G, Baran Y. Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;81:275-85.
7. Chen H-Y, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res* 2011;4:973-83.
8. Evangelisti C, Evangelisti C, Chiarini F, Lonetti A, Buontempo F, Neri LM, et al. Autophagy in acute leukemias: a double-edged sword with important therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:14-26.
9. Vernon PJ, Tang D. Eat-me: autophagy, phagocytosis, and reactive oxygen species signaling. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:677-91.
10. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010;90:1383-435.
11. Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med* 2003;9:65-76.
12. Duffy A, Le J, Sausville E, Emadi A. Autophagy modulation: a target for cancer treatment development. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015;75:439-47.
13. Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012;22:43-61.
14. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 2009;11:468-76.
15. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatic*. 2006;7:85.

16. Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Delomenie C, Nicolas V, et al. Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 2013;32:2261-72.
17. Saito H, et al. Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res.* 1993;53:3382–3385.
18. Sun Y, Liu J-h, Jin L, Lin S-m, Yang Y, Sui Y-x, et al. Over-expression of the Beclin1 gene upregulates chemosensitivity to anti-cancer drugs by enhancing therapy-induced apoptosis in cervix squamous carcinoma CaSki cells. *Cancer Lett* 2010;294:204-10.
19. Cao Q-H, Liu F, Yang Z-L, Fu X-H, Yang Z-H, Liu Q, et al. Prognostic value of autophagy related proteins ULK1, Beclin 1, ATG3, ATG5, ATG7, ATG9, ATG10, ATG12, LC3B and p62/SQSTM1 in gastric cancer. *Am J Transl Res* 2016;8: 3831-47.
20. Neri LM, Cani A, Martelli AM, Simioni C, Junghanss C, Tabellini G, et al. Targeting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in B-precursor acute lymphoblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia* 2014;28:739-48.
21. Wallington-Beddoe CT, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. FTY720 produces caspase-independent cell death of acute lymphoblastic leukemia cells. *Autophagy* 2011;7;707-15.
22. Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013;2013:118-25.
23. Torgersen ML, Engedal N, Bøe S-O, Hokland P, Simonsen A. Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t (8; 21) AML cells. *Blood* 2013;122:2467-76.
24. Karvela M, Baquero P, Kuntz EM, Mukhopadhyay A, Mitchell R, Allan EK, et al. ATG7 regulates energy metabolism, differentiation and survival of Philadelphia-chromosome-positive cells. *Autophagy* 2016;12:936-48.